

**Standardisierung und Funktionsprüfung der
teilautomatischen Standardfibrinpapier-Lysebestimmung
nach Goossens**

Nikolaus Buchheim

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555615_0078

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Professor N. Zöllner

Standardisierung und Funktionsprüfung der teilautomatischen
Standardfibrinpapier-Lysebestimmung nach Goossens

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Nikolaus Buchheim
aus Feldafing

München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. N. Goossens

Mitberichterstatter: Professor Dr. N. Zöllner

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 8.2.1977



Herrn Professor Dr. N. Goossens danke ich für
die wertvolle Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
A. <u>EINLEITUNG</u>	1
B. <u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	3
I. <u>Teilautomatisches Gerät 1974</u>	3
1. Funktion	3
1.1. Abbildung und Beschreibung	4
1.2. Arbeitsanleitung	6
2. Neuerungen	7
3. Ergebnisse	8
4. Diskussion	10
II. <u>Teilautomatisches Gerät 1975</u>	11
1. Neuerungen	11
2. Ergebnisse	11
III. <u>Teilautomatisches Gerät 1976</u>	12
1. Funktion	12
1.1. Abbildung und Beschreibung	12
1.2. Arbeitsanleitung	15
2. Durchgeführte Untersuchungen zur Testung des Geräts	17
3. Ergebnisse	21
3.1. Standardisierung	21
3.2. Ergebnisse zur Änderung der Inkubationszeit	23
3.3. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	23
4. Diskussion	30
C. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	32
D. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	33
E. <u>LEBENS LAUF</u>	35

A. EINLEITUNG

Für den nicht mit der Materie Vertrauten sei das Prinzip der Standardfibrin-papier-Lyse (SFPL) nach Goossens (2, 3, 5, 6, 8, 12) kurz zusammengefaßt.

Chromatographiepapier wird mit in der Menge und Konzentration definierter Rinderfibrinogenlösung getränkt, die mittels Thrombinlösung in Fibrin umgewandelt wird. Dieses sog. Standardfibrinpapier (SFP) wird industriell in genormtem Format hergestellt. Die SFP-Streifen werden in der auf fibrinolytische Aktivität zu prüfenden Testlösung (z.B. Citratplasma) inkubiert. Danach erfolgt die Weiterbehandlung etwa analog dem Vorgang bei der Elektrophorese, d.h. nach Färbung mit Amidoschwarz und Entfärbung mit Methanoleisessig wird der Restfibringehalt des SFP quantitativ photometrisch mit der Eluationsmethode bestimmt.

Fibrinolysebestimmungsmethoden wie Clotlysiszeit nach Fearnly (4), Euglobulinlysiszeit nach Milstone (10), Fibrinplattenmethode nach Astrup und Møllertz (1), Thrombelastographie nach Hartert (7) u.a., auf deren detaillierte Beschreibung an dieser Stelle verzichtet wird, muß man zu den halbquantitativen Bestimmungen zählen. Sie liefern von Labor zu Labor meist nicht ausreichend reproduzierbare und damit gut vergleichbare Ergebnisse.

Im Unterschied zu diesen Verfahren arbeitet die SFPL mit standardisiertem Fibrin-papier als "Reagens" und unter weitgehend standardisierten Versuchsbedingungen, die in jedem größeren medizinisch-technischen Labor reproduziert werden können.

Der Einführung der SFPL als Routinebestimmung standen anfangs ein erheblicher Aufwand an Zeit, Personal und Reagenzien im Wege. Weitere Vereinfachung und Rationalisierung erschienen deshalb notwendig.

R. Metzke und P.G. Linke (Halle, 1972), (9) berichten über eine Modifikation des Verfahrens. Sie bedienten sich einer Plexiglaskammer, in deren Untersuchungsfächern die SFP nicht mehr horizontal, sondern vertikal inkubiert wurden. Platzersparnis und Verzicht auf einen Brutschrank waren die Fortschritte dieses Systems.

Seit einem von H. Rath (11) konzipierten Boxensystem mit Schüttelmaschine und Zeitschaltwerk, können Färben und Entfärben der zu untersuchenden SFP-Streifen automatisch vorgenommen werden. Die ersten Resultate mit der so verbesserten Version legte Weber 1975 (13) vor.

Die Weiterentwicklung brachte eine Reihe von Änderungen bei den verwendeten Geräten und der Ausführung der Methode. Die vorliegende Arbeit gibt einen Überblick über die wichtigsten technischen Modifikationen und stellt als deren Ergebnis ein neues vereinfachtes Verfahren vor, das für die Routineanwendung geeignet ist. Die Funktionsfähigkeit wurde statistisch überprüft.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Teilautomatisches Gerät 1974

Nachdem der Handbetrieb beim Färben und Entfärben in dem von Weber (13) verwendeten technischen System aufgegeben werden konnte, versuchten wir, die gleiche Automatisierung auch auf das Wässern und Eluieren der Papierstreifen auszudehnen. Nach den Konstruktionsplänen von H. Rath wurde das erste hier abgebildete Fibrinolysegerät erstellt.

1. Funktion

Die Abbildung und die im folgenden kurz zusammengefaßte Betriebsanleitung erläutern die Funktion dieser Apparatur.

1.1. Abbildung und Beschreibung

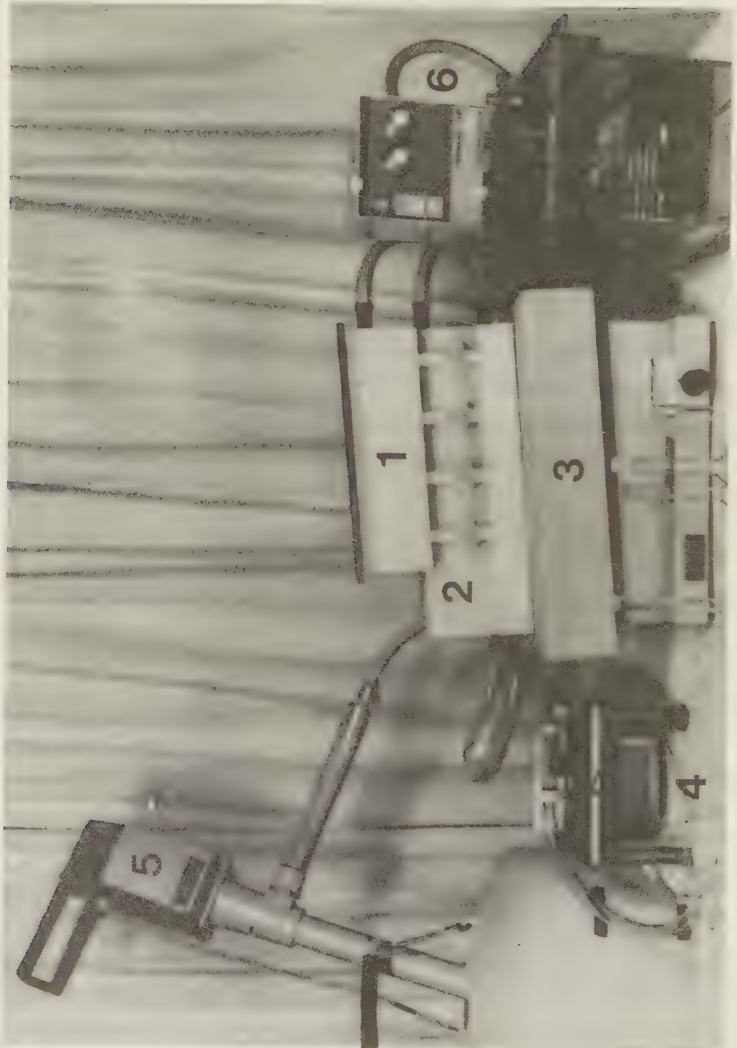


Abbildung 1

Beschreibung zu Abbildung 1

- 1 = Kunststoffkasten, in dem die 8 voneinander getrennten Testboxen untergebracht sind.
- 2 = Heizkammer
- 3 = Taumelscheibe
- 4 = Elektroventil für den Ablauf der Reagenzien
- 5 = Elektroventil für den Zulauf der Reagenzien
- 6 = Wasserbad mit Thermostat und Umwälzpumpe

Das Zeitschaltwerk, das die Funktion von Elektroventil und Elektropumpe regelt, ist nicht abgebildet.

1.2. Arbeitsanleitung für das erste halbautomatische Gerät (1974)

Wir bringen eine Arbeitsanleitung für dieses SFPL-Gerät von H. Rath, um das Verständnis für die nachfolgenden Verbesserungen zu erleichtern und weil ein Teil der Vorgänge für die letzte wesentlich abgeänderte Methode übernommen werden konnte.

Wegen der Toträume im Ablaufsystem mußten die Mengenverhältnisse der Reagenzien sowie des zu prüfenden Plasmas geändert werden.

1.2.1. Testansatz und Inkubation

- a) Citratblut (1 Teil 3,8 %iger Natriumcitrat-Lösung + 4 Teile Vollblut, 5 min. bei 3.000 rpm zentrifugieren, Plasma ohne Formelemente abhebern).
- b) 1,5 ml Citratplasma und 10 ml Veronal - HCl - Puffer in Reagenzgläser pipettieren und durch leichtes Schütteln (Fingerschutz) vermischen. Ablaufhähne schließen! Inhalt der Reagenzgläser in die Testboxen einfüllen. Standardfibrinpapier (SFP)-Streifen mit der Pinzette einlegen, Deckel schließen und 20 Std. mit Wasserbad, Umwälzpumpe und Thermostat (48° C) inkubieren.

1.2.2. Wässern

Gereinigte Zulaufpumpe (ohne Flüssigkeit im Totraum, Schläuche etc.) in Wasserbehälter stellen (Wasserbehälter gespült und mit frischem Leitungswasser gefüllt). Walze für Wässerung bei 360°-Stellung ins Zeitschaltwerk einsetzen. Ablaufhähne öffnen! Leerpapier inkubieren. Schüttler und Zeitschaltwerk einschalten. Wässerungszeit = eine Walzendrehung (ca. 20 min.), bis sich das gemeinsame Ablaufventil öffnet und das Wasser völlig abgelassen ist.

Zeitwerk und Schüttler ausschalten. Wasser aus dem Totraum der kommunizierenden Röhren durch Kippen des Gerätes entleeren.

1.2.3. Färben und Entfärben

Pumpe aus dem Wasserbehälter nehmen, Wasser ablaufen lassen, trocknen und in Elphorentfärber stellen.

Behälter mit verbrauchtem Spülwasser ausleeren. "Wässerungswalze" des Zeitschaltwerks gegen "Entfärberwalze" austauschen und in 200°- bzw. 20°-Stellung bringen. Deckel der Boxen öffnen und ca. 350 ml Amidoschwarz-Lösung einfüllen. Deckel schließen, Zeitschaltwerk und Schüttler einschalten. Entfärberwechsel wird nun selbständig (alle 10 min.) vorgenommen. Laufzeit 3 Std.

1.2.4. Trocknen und Reinigen

SFP-Streifen mit der Pinzette entnehmen, auf Filterpapier trocknen. Boxen, Ablaufstutzen und -ventile (durch Drehen) mit NaOH-Lösung und Bürstchen reinigen, anschließend mit Wasser spülen und mit Leinenlappen trocknen.

1.2.5. Eluieren

Ablaufhähne schließen! 50 ml 0,1 n NaOH in die Boxen einpipettieren. Getrocknete SFP-Streifen einlegen und unter Schütteln 30 min. eluieren. Anschließend Extinktion der eluierten Lösung im Eppendorf-Photometer bestimmen.

2. Neuerungen

Die wichtigsten Neuerungen dieses Systems seien kurz zusammengefaßt:

- 2.1. Zusätzlich zum Färben und Entfärben (13) wurden jetzt Wässern und Eluieren automatisiert.

- 2.2. Die Inkubation erfolgte nicht mehr im Brutschrank. Die Boxen wurden während der Inkubation durch Konvektion mit Wasserbad, Umwälzpumpe und Thermostat beheizt.
- 2.3. Alle Arbeitsgänge wurden in den selben Boxen vorgenommen. Die Glasschälchen beim Inkubieren und Eluieren entfielen.
- 2.4. Die Papierrandzonen wurden nicht mehr verworfen. Der gesamte Papierstreifen (3,9 cm x 7,5 cm) wurde eluiert. Die NaOH-Elutionsmenge mußte entsprechend der Papierfläche verdoppelt werden (50 ml 0,1 NaOH).

3.- Ergebnisse

Bei den Testserien mit diesem ersten teilautomatischen Gerät wurde vorläufig auf die Elution der gefärbten, entfärbten und getrockneten Papierstreifen verzichtet. Dies sollte uns den Überblick über die Anfärbung aller Papierstreifen verschaffen. Inhomogene Färbung der SFP, die bis dahin häufig aufgetreten war, konnte jetzt im Vergleich der Papierstreifen untereinander beurteilt werden. Vor- und Nachteile des Systems konnten wir besser erkennen.

3.1. Vorteile dieser Methode

- 3.1.1. Die schon erwähnte weitere Automatisierung bedeutete Vereinfachung und Arbeitersparnis.
- 3.1.2. Das geschlossene System verhindert die unangenehme Geruchsentwicklung durch den Eisessig.
- 3.1.3. Die Papierstreifen wurden nur einmal während aller Arbeitsgänge aus den Boxen entfernt. Dies geschah beim Trocknen. Die Beschädigung der Randbezirke, wie sie bei der alten Methode durch zu häufiges Anfassen entstand, war nun vernachlässigbar gering.

- 3.1.4. Das unkontrollierte Wässern unter dem Leitungshahn wurde durch Elektropumpe und Zeitschaltung standardisiert.

3.2. Nachteile

- 3.2.1. Die Inkubation im Brutschrank durch systemeigene Beheizung zu ersetzen, erfordert einen unverhältnismäßig hohen materiellen und instrumentellen Aufwand.
- 3.2.2. Wasserbad, Umwälzpumpe, Heizspirale und Thermostat implizierten die Risiken technischen Versagens. Der Dauerbetrieb von jeweils 20-stündiger Inkubation führte schon bald zum Ausfall des empfindlichen Thermostaten.
- 3.2.3. Das Gerät war leider so dimensioniert, daß es gerade nicht mehr in den Brutschrank paßte. Ohne selbständige Beheizung konnte es nicht benutzt werden.
- 3.2.4. Die Wasserkonvektion gewährleistete keine gleichmäßige Wärmeverteilung über der Bodenplatte der Boxen. Sog. "kalte Ecken" und Wärmestauungen traten auf. Die inkonstante Temperatur führte vermutlich zu den gelegentlich festgestellten spontanen Gerinnungsvorgängen bei der Inkubation.
- 3.2.5. Das Zulaufsystem verursachte während des Einpumpens der Reagenzien, daß die verschiedenen Boxen verschieden hoch mit Flüssigkeit gefüllt wurden. Ein Ausgleich des Flüssigkeitspegels über die kommunizierenden Röhren stellte sich nur langsam ein. Die Unregelmäßigkeiten hielten wir zunächst für unbedenklich, so daß wir das Zulaufsystem beim nächsten Gerätetyp nicht wesentlich änderten.
- 3.2.6. Zuverlässig gleichmäßige Anfärbung der Papierstreifen war noch nicht gewährleistet.

Adhäsion der Papierstreifen am Boden, Verlegen des Abflusses und "Pfützeneffekt" auf unebener oder zu rauher Unterlage konnte bei allen Bestimmungsphasen beobachtet werden. Ersatz der "zweidimensionalen" Schüttelmaschine durch die "dreidimensionale" Taumelscheibe verlangsamte die Bewegung von Papier und Flüssigkeit in den Boxen und verstärkte sogar diese unerwünschten Erscheinungen. Der geringe Schüttelleffekt ist u.E. verantwortlich für Anlagerung von schon gelösten Fibrinresten, von spontan auftretenden kleinen Gerinnseln oder sonstigen Plasmaproteinkonglomeraten.

- 3.2.7. Insuffiziente Verarbeitung des Boxenmaterials in Ecken und an Kanten führte zu unzugänglichen Schmutznischen, die alle Arbeitsgänge mit Ungenauigkeiten belasteten.
- 3.2.8. Der große Totraum zwischen Abflußöffnung und Abflußventil zwang uns zur Volumänderung von Plasma und Puffer: Statt früher 6,5 ml V-Puffer + 1 ml Citratplasma, jetzt 2,5 ml Plasma + 10 ml Puffer. Die Flüssigkeit des Totraums hat keinen direkten Kontakt mit dem Fibrinpapier und nimmt wahrscheinlich an der Fibrinolyse nicht teil.
- 3.2.9. Das Leitungssystem von Abflußöffnung zum Ablaufventil lag außerhalb der beheizten Zone.

4. Diskussion

Die Qualität der mit dieser Bestimmungsmethode ausgewerteten SFP-Streifen (gefärbt, entfärbt, getrocknet) zeigte, daß es trotz all dieser technischen Fehlerquellen möglich war, brauchbare Ergebnisse zu erzielen.

Der Anfärbungsvergleich zwischen Chromatographiepapier und "aktiviertem" und "gestopptem" Fibrinpapier (= Fibrinpapier, das in mit Streptokinase "aktiviertem" oder mit Antifibrinolytika "gestopptem" Plasma inkubiert wurde) ließ diese gut voneinander unterscheiden und indentifizieren.

Das ermutigte uns, das Grundkonzept dieses Systems beizubehalten und einen zweiten Prototyp, der den neuen Schwierigkeiten und Erkenntnissen Rechnung tragen sollte, zu erstellen.

II. Zweites teilautomatisches Gerät 1975

1. Neuerungen

Das zweite Fibrinolysegerät zeigt folgende Verbesserungen:

- 1.1. Die Abmessung des Geräts gestattet die Inkubation im Brutkasten. Damit konnte man auf die komplizierte Beheizung verzichten.
- 1.2. Das vorteilhaftere Material und seine exakte Verarbeitung vermieden Unebenheiten und Rauigkeiten. Klarsichtplexiglas erlaubte, die Papiere in allen Bestimmungsphasen zu beobachten.
- 1.3. Der Totraum wurde durch neue Ventile vermindert und konnte besser heizt werden.
- 1.4. Kunststoffbälkchen vor jedem Boxenabfluß verhinderten Verlegen des Abflusses durch die Papiere.

2. Ergebnisse

Die Beschreibung der Versuche mit dem zweiten Fibrinolysegerät (1975) und deren Auswertung bleiben der Arbeit von J. Woyzuck (14) vorbehalten. Trotz der angeführten modifizierten Konstruktion entstanden neue technische Schwierigkeiten und das Hauptproblem, die "Pfützenbildung" zwischen Papier und Boxenboden mit den daraus resultierenden Farbflecken, war noch nicht zufriedenstellend gelöst. Die immer wieder als Ursache für Ungenauigkeiten bezichtigte Kontaktfläche zwischen Fibrinpapier und Boxenboden sollte in einer neuen Konzeption der Methode reduziert bzw. beseitigt werden.

III. Drittes teilautomatisches Gerät 1976

J. Woyzuck (14) entwickelte mit unserer Zusammenarbeit ein neues Fibrinolysegerät.

Wir folgten der Versuchsanordnung von Metze und Linke (9) und wandelten den horizontalen Untersuchungsraum in einen vertikalen um. Die zu prüfenden Plasmen werden in Kunststoffkammern, in denen elf Zellen (vertikale Untersuchungsfächer) untergebracht sind, inkubiert und ausgewertet. Für die einzelnen Phasen der Bestimmungsmethode benötigt man entsprechend den unterschiedlichen Flüssigkeitsmengen (Inkubationsansatz 8 ml, Eluationsansatz 25 ml) und Funktionen (Spülvorgänge) drei verschiedene Kammersysteme (Boxen).

Die bisherigen halbautomatischen Verfahren verarbeiten das SFP im Gegensatz zur von Hand durchgeführten Originalmethode in schlecht kontrollierbarer Horizontallage (schwimmend, aber häufig am Boden oder an den Wänden anliegend).

Das SFP wird im neuen Gerät in einem Papierhalter fixiert. Der Papierhalter ist an einem Exzenter aufgehängt, der von einem Elektromotor rotiert wird. Ein Getriebe, das dem Elektromotor vorgeschaltet ist, gewährleistet definierte Hubhöhe (1,5 cm) und Hubfolge (1 mal/sec.).

Der Zulauf der Reagenzien erfolgt aus den höher gelagerten (ca. 50 cm über dem Labortisch) Flaschen.

Hierdurch entfällt die elektrische Zulaufpumpe bzw. ein Anschließen an die Wasserleitung und eine gleichbleibende Zuflußgeschwindigkeit ist u.a. besser garantiert.

1. Funktion

1.1. Abbildung und Beschreibung

Die Abbildung 2 zeigt in Übersicht den Prototyp des Fibrinolysegeräts 1976. Die technischen Details werden genauer in der Arbeit von J. Woyzuck (14) beschrieben.

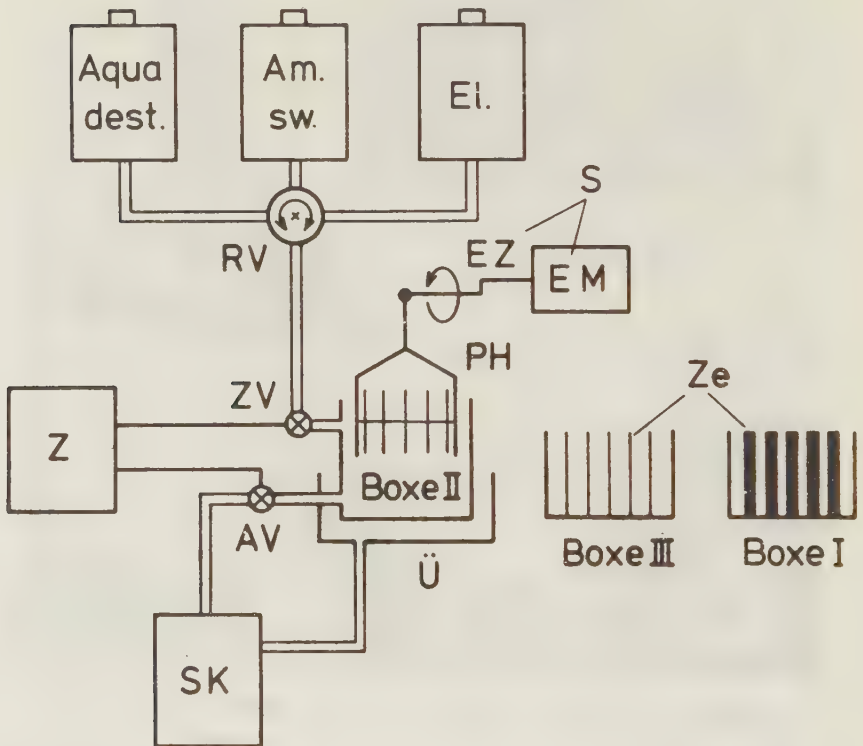
Abbildung 2



- | | |
|--|--|
| 1. Aqua dest. | 7. Elektroventil für Ablauf (AV) |
| 2. Amidoschwarz (Am.sw.) | 8. Boxe I (Inkubation) |
| 3. Elphor-Entfärber (El.) | 9. Boxe III (Eluation)) mit Zellen (Ze) |
| 4. Schüttelgerät (S), bestehend aus Exzenter (EZ) u. Elektromotor (EM) | 10. Papierhalter (PH) |
| 5. Boxe II (Wässern und Entfärben) | 11. Überlaufschutz (Ü) (Auffangwanne, die über einen Schlauch an den Sammelkanister für gebrauchte Reagenzien oder an ein Ausgußbecken angeschlossen ist.) |
| 6. Elektroventil für Zulauf (ZV) | 12. Zeitschaltwerk (Z) |

Die nachfolgende Skizze (Abb. 3) erläutert die Funktion des auf Seite 13 abgebildeten Gerätes.

Abbildung 3



Am.sw.	Amidoschwarz	Z	Zeitschaltwerk
El.	Elphor-Entfärber	SK	Sammelkanister für verbrauchte Reagenzien
RV	Reagenzienventil	Ü	Überlaufschutz
ZV	Zulaufventil	Ze	Zellen (Untersuchungsfächer)
AV	Ablaufventil	S	Schüttelgerät (EZ + EM)

1.2. Arbeitsanleitung für die teilautomatische Fibrinolysebestimmung
nach Goossens mit dem Standardfibrinpapier (SFPL)

1.2.1. Testansatz und Inkubation:

a) Herstellung des Citratplasmas:

1 Teil 3,8 %iger Natriumcitrat-Lösung + 4 Teile Nativ-Vollblut
(Mischverhältnis wie für Westergren BKS, für den Regelfall (Doppel-
bestimmung von gestopptem und ungestopptem Plasma) benötigt man
8 ml Nativblut + 2 ml Na-citr.) 5 min. bei ca. 3.000 rpm zentri-
fugieren, Plasma zuverlässig ohne Formelemente abgießen oder ab-
hebern (also unter Verwerfung von dicht über den Formelementen
befindlichem Plasma).

b) Ansatz

1,0 ml Citratplasma (CPL) + 6,0 ml Veronal/HCL-Puffer (PH 7,3)
+ 1,0 ml etwaige Zusätze wie Inhibitoren (z.B. EACA, AMCHA,
PAMBA, TRASYLOL) und Aktivatoren (wie Streptokinase) oder, wenn
keine aktiven Zusätze vorgesehen sind, stattdessen 1,0 ml Puffer zur
Erhaltung der Volumengleichheit (also Gesamtvolumen des Ansatzes
immer 8,0 ml) in entsprechende Reagenzgläser pipettieren. Mischen
durch mehrmaliges Schwenken (nicht schütteln) der Reagenzgläser.

Plasma in die vorgesehenen Zellen der Inkubationsboxe (I) einfüllen.

Neu: Original SFP-Streifen M + N (39 x 75 mm)⁺⁾ nur längs geteilt
(mit Schablone halbiert), also 19,5 x 75 mm (ca. 15 cm²) verwenden!
Halbierte SFP-Streifen mit Pipette sowie Leerpapier (Chromatographie-
papier) in die der Zelle entsprechende gleiche Nummer des Papierhalters
einbringen, Deckel schließen und 20 h im Thermostaten bei 37° C in-
kubieren.

⁺⁾ Hersteller: Macherey, Nagel & Co.
 516 Düren

1.2.2. Wässern

Beide Hähne für den Zulauf aus der Aqua dest.-Flasche öffnen (zusätzlich den Hahn für den Luftdruckausgleich oben an der Flasche nicht vergessen).

Walze des Zeitschaltwerks für die Wässerung bei 360° - 0° -Stellung einsetzen. Papierhalter aus Boxe I in Wässerungsboxe II einsetzen und an der Aufhängung des Exzentrers befestigen.

Antriebsmotor des Exzentrers und Zeitschaltwerk einschalten, 50 min. wässern (eine Walzendrehung = 20 min.), dann bei ca. 160° -Stellung, nachdem das Wasser abgelaufen ist und sich keine Flüssigkeit in der Boxe II befindet, Zeitschaltwerk abschalten, Papierhalter herausnehmen, Leerpapiere in die freien Plätze einfügen, Wasserzulauf schließen und Amidoschwarzzulauf öffnen, Papierhalter einsetzen und Zeitschaltwerk wieder einschalten.

1.2.3. Färben und Entfärben

Wegen der höheren Viskosität und geringeren Füllhöhe (wegen Alterung max. 1 Liter) von Amidoschwarz, genügt die für alle Flüssigkeiten gleich programmierte Zulaufdauer beim Färben nicht.

Es muß also der Zulaufhebel am Zeitschaltwerk mit Hand bedient werden, bis der Papierhalter zusammen mit den SFP-Streifen nicht mehr aus der Amidoschwarzlösung auftaucht.

Danach sofort den Amidoschwarzzulauf schließen und die Elphorhähne öffnen. Färben (10 min.) und Entfärben (5, 5, 10, 5, 5, 10, 5, 5, 10, 5, 5 min.) wird nun automatisch vorgenommen, Gesamtlaufzeit 100 min.

1.2.4. Trocknen und Reinigen

Papierhalter mit SFP-Streifen entnehmen, auf Filterpapier zum Trocknen stellen (30 min. bei 20° C oder 10 min. bei 37° C).

1.2.5. Eluieren

25 ml 0,1 n NaOH in jede Zelle (Z) der Eluationsboxe (III) pipettieren. Papierhalter mit den trockenen SFP einbringen und 30 min. mittels Schüttelgerät (S) (Hubhöhe ca. 1 cm, Hubfolge 1 mal pro sec.) eluieren. Anschließend Extinktion (E) der blaugefärbten Eluationslösung mit dem Eppendorf-Photometer bestimmen.

Dauer der Fibrinolysebestimmung nach der Inkubation ca. 210 min. = 3 1/2 Stunden.

1.2.6. Hinweise und mögliche Fehlerquellen sh. Seite (22).

2. Durchgeführte Untersuchungen zur Testung des Geräts

2.1. Standardisierung

Die ersten Versuchsserien ohne Inkubation, Eluation und photometrische Auswertung dienten ausschließlich der Programmierung des Zeitschaltwerks, der Festlegung von Zulauf- und Ablaufzeiten, des daraus resultierenden Reagenzienverbrauchs sowie der Standardisierung der gesamten Versuchsdurchführung.

2.2. Änderung der Inkubationszeit

Es war wiederholt aufgefallen, daß die zu untersuchende Inkubationslösung nach 20 Std. schneeflockenartig getrübt war. Bei den ausgefällten Partikeln handelte es sich wahrscheinlich um kleine Gerinnsel. Diese Ausflockung schien erst in den letzten Stunden der Inkubation einzutreten.

Parallel zu den noch später angeführten Versuchsserien bestimmten wir das Ausmaß der Trübung und die Extinktionswerte bei verschiedenen langer Inkubationsdauer.

Wir inkubierten Plasma und SFP im Abstand von fünf Stunden. Dadurch erhielten wir bei einer Versuchsausdehnung bis auf 20 Stunden die Effekte von vier verschiedenen Inkubationszeiten: 5, 10, 15, 20 Stunden.

Außer theoretisch-wissenschaftlichen Erkenntnissen hätte die Inkubationszeitveränderung praktischen Nutzen (arbeitszeitmäßig) nur, wenn es gelänge, sie auf 3 Stunden zu verkürzen, um Ansatz und Auswertung am selben Tag durchzuführen. Wir untersuchten deshalb zusätzlich zur 5-Std.-Serie die Fibrinolyse nach 3-stündiger Inkubation, ob solch kurze Inkubationsdauer ausreichende Lyse nachweisen kann (sh. hierzu S. 23).

2.3. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Funktionsfähigkeit des neuen Systems wurde durch die statistische Auswertung der photometrisch bestimmten Extinktionswerte überprüft. Ein wichtiges Kriterium dieser Funktionsfähigkeit ist die Reproduzierbarkeit der mit der Bestimmungsmethode ermittelten Ergebnisse. Zwei verschiedene Untersucher führten deshalb unter standardisierten Bedingungen die gleichen Testserien durch. Mit der neuen Methode ermittelten sie die Extinktionswerte von Leerpapier, von SFP, das zu einem Teil mit "ungestopptem" Plasma, zum anderen Teil mit "gestopptem" Plasma inkubiert worden war (sh. hierzu S. 23).

2.3.1. Versuchsdurchführung

Um vergleichbare Resultate zu erhalten, benutzten wir für alle Messungen das Mischplasma von zwei gesunden Versuchspersonen (sog. Poolplasma).

Herstellung des Poolplasmas:

Das Testblut (1 Teil 3,8 %ige Natriumcitratlösung + 4 Teile Venenblut) wurde bei beiden Probanden gleichzeitig durch je eine Abnahme gewonnen. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei ca. 3.000 rpm wurde das Plasma abgehebert und zu einem Pool vermischt. Bei ca. einem Drittel des Plasmas wurde die lytische Aktivität mit Trasylol (1000 E Tras./ml Plasma bei Serie 1, 100 E Tras./ml Plasma bei Serie 3) gestoppt. Dann wurden das gestoppte und das ungestoppte Plasma in Versuchsportionen in Plastikreagenzgläser abgefüllt, mit Plastikstöpseln luftdicht abgeschlossen und bei minus 30° (Tiefkühlschrank) eingefroren. Aus diesem einheitlichen Gefrierplasmapool führten wir alle Bestimmungen durch.

2.3.2. Versuchsablauf

Bei jedem Versuch erhielten wir entsprechend der Anzahl der Inkubationszellen max. 11 Meßwerte.

Das Versuchsprogramm aller durchgeführten Bestimmungen ist in der folgenden Übersicht zusammengestellt.

Tabelle 1

Anzahl der ermittelten Werte

	Datum	Leerwert	Plasma gestoppt (1000 E Tras/ml)	Plasma ungestoppt
Untersucher A	14.9.	2	2	6
	15.9.	2	2	6
	17.9.	2	2	6
	18.9.	1	-	10
	19.9.	1	-	10
	20.9.	5	8	6
	21.9.	10	10	-
	23.10.	2	(100 E Tras/ml) 2	4
	24.10.	1	2	4
	26.10.	1	2	4
	Summe	27	30	56
Untersucher B	22.9.	2	3	6
	23.9.	5	-	5
	24.9.	5	-	6
	Summe	12	3	17

3. Ergebnisse

3.1. Standardisierung

- 3.1.1. Die Standardisierung von Materialien, Reagenzien und technischen Daten wird hier nicht behandelt. Sie ist an anderer Stelle (14) genau beschrieben.
- 3.1.2. Die Standardisierung des Verfahrens ist als Arbeitsanleitung auf Seite 15 vorweg genommen. Die aus den Versuchsserien gewonnenen Erfahrungen veranlassen uns, die Arbeitsanleitung um einige wichtige Zusätze zu erweitern.

3.1.2.1. Hinweise zur Behandlung von Plasmen

1. Alle Plasmen dicht verschlossen aufbewahren.
2. Alle Plasmen müssen schlieren- oder gerinnselfrei verwendet werden (notfalls mit großporigem kleinen Filter, z.B. wie für Urin, filtrieren).
3. Frischplasma muß bei Zimmertemperatur spätestens nach 30 min. inkubiert oder bei minus 30° C tiefgefroren werden. Wird es nicht sofort inkubiert bzw. tiefgefroren, kann es nur bis zu 90 min. (gut verschlossen bei + 4° C) aufbewahrt werden.
4. Gestopptes Plasma (mit Zusatz von EACA, AMCHA, PAMBA oder TRASYLOL) vor dem Einfrieren stoppen zum Verhindern von "Eigenlyse" während der Lagerung. Es dient als sog. Normplasma als Bezugswert und zum Einsetzen in die Formel zur Prozentualisierung.
5. Gefrierplasma bei minus 30° C aufbewahrt hält sich ca. 5 - 6 Monate. Im Wasserbad (37° C) ca. 10 - 15 min. auftauen.
6. "Aktiviertes" Plasma z.B. mit Streptokinase (SK) oder anderen Aktivatoren vor dem Inkubieren aktivieren.
7. Puffer bei + 4° C aufbewahren, vor dem Ansetzen auf Zimmertemperatur (20° C) erwärmen.

3.1.2.2. Fehlerquellen

1. Sofort nach dem Ende der Bestimmung müssen die 3 Boxen gereinigt und aus dem Schlauchsystem verbliebene Flüssigkeiten abgelassen werden. Boxe (I) mit Leitungswasser und wasserlöslichen nicht aggressiven Spülmitteln reinigen, anschließend 1 mal mit Aqua dest. nachspülen und mit gefaltetem Filterpapier trocknen. Boxe (II) mit wenig $n/10$ NaOH und Bürste säubern und mit Wasser nachspülen. Boxe (III) mit Wasser ausspülen und mit gefaltetem Filterpapier trocknen.

Empfohlen: Boxe I und II zur Zeitersparnis während der Eluation (Boxe III) reinigen (30 min.). Boxen nicht über 40°C erhitzen.

2. Die Zellen der Boxen I und II müssen deutlich nummeriert sein (1- 11), ebenfalls muß der Papierhalter gekennzeichnet sein, so daß er immer mit der gleichen Seite nach vorne eingesetzt wird, damit keine Verwechslung der Papiere stattfinden kann.
3. Bei allen Flaschen (Aqua dest. + Elphor) vor Gebrauch einmal obere Einfüllhöhe markieren. Unteren Flüssigkeitsstand nach einem reibungslosen Versuch ebenfalls markieren. Nach jedem Versuch die Reagenzien bis zur oberen Markierung nachfüllen, sonst ändert sich die Zulaufgeschwindigkeit, davon abhängig die Füllhöhe der Boxe II und damit der gesamte Reagenzienverbrauch für einen Versuch.
Wegen der möglichen Alterung von Amidoschwarz (Verbrauch bei einer Lysebestimmung ca. 500 ml) wird max. 1 Liter in die Flasche eingefüllt. Der Flüssigkeitsstand muß dabei nicht kontrolliert werden, da der Zulauf von Amidoschwarz nicht vollautomatisch geregelt wird (sh. S. 16).
4. Die Elektroventile verschmutzen bei häufigem Gebrauch. Funktion überprüfen, wenn nötig zerlegen und gründlich reinigen!
Funktionsprüfung: Nach jedem Versuch muß der Flüssigkeitsspiegel der Reagenzien mit der unteren Markierung übereinstimmen.

5. Fibrinpapiergröße kontrollieren, wenn nötig zuschneiden!
6. Flaschen in regelmäßigen Zeitabständen völlig entleeren und reinigen!
7. Überlaufschutz muß immer angeschlossen sein!

3.2. Ergebnisse zur Änderung der Inkubationszeit

- 3.2.1. Die optischen Vergleiche der in fünfstündigem Abstand angesetzten Proben ergaben, daß bei jeder mit Fibrinpapier inkubierten Plasma-Pufferlösung zwischen der 15. und 20. Stunde eine auffallende Trübung einsetzte. Bis zur 15. Stunde blieben die Lösungen glasklar. Danach wurden die Papierstreifen wie üblich weiter verarbeitet (gewässert, gefärbt, entfärbt und eluiert).
- 3.2.2. Die informativen 3 h- und 5 h-Werte zeigten durchschnittlich geringere Lyse als die 20 h-Werte.
Die zu geringe Anzahl dieser Experimente erfordert für statistische Aussagen jedoch Nachprüfung in größeren Serien. Die Ergebnisse reichen nicht aus, die bisherige Inkubationszeit von 20 h aufzugeben. Wir halten uns deshalb weiterhin an die originale 20-Stundenvorschrift, weil sie außerdem arbeitstechnische Vorteile bietet.

3.3. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

3.3.1. Statistische Auswertung

Zur Beurteilung der Messungen bedienten wir uns statistischer Berechnung mit Mittelwert ($\bar{X}$), Standardabweichung (σ) und Variationskoeffizienten (VK).

Wir verwendeten an Stelle der prozentualen Lyse nur die absoluten Extinktionswerte (E).

3.3.2. Meßwerte

Alle Meßwerte der beiden Untersucher A und B sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt. Bei einigen Auswertungen kam es zu sog. "Ausreißern". Sie werden, so weit ihre Ursache bekannt ist, als "erklärbare Ausreißer" bezeichnet.

Die Anzahl der Werte (sechs) für 100 E Tras/ml (Tabelle 2) und für 1000 E Tras/ml (drei) (Tabelle 3) ist für statistische Aussagen zu klein. Die dabei angegebenen Werte für $\bar{X}$, σ und VK sind als grobe Orientierungen zu verstehen.

Die Varitationskoeffizienten als Maß für die Fehlerbreite des Verfahrens schwanken unter Einbezug der "Ausreißer" zwischen 3 - 7 % und genügen damit den Anforderungen, die an derartige Analysen gestellt werden.

Hierbei ist zu berücksichtigen, daß bei der Erprobung einer neuen Methode mangels ausreichender Erfahrung vermeidbare Fehlerquellen entstehen, die teilweise im Verlauf der Studie als solche erkannt wurden. Der Routineanwendung des Verfahrens bleibt es vorbehalten, weitere Fehlerursachen auszuschalten. Unter Betrachtung dessen, darf man die ermittelten VK's als akzeptabel bezeichnen, da sie außerdem die VK's anderer Autoren erreichen. Eine auch nur annähernd geringe Fehlerbreite ist im übrigen von keiner der bisher beschriebenen Fibrinolysebestimmungsmethoden bekannt.

Die Tabelle (2, S. 26) listet die beobachteten Fehler auf. Wir nehmen an, daß sie mit großer Wahrscheinlichkeit die Ursache für Werte sind, die stark von der Norm abweichen und bezeichnen sie als "erklärbare Ausreißer". Die tatsächliche Abhängigkeit zwischen diesen Fehlern und den "Ausreißern" könnten jedoch nur größere Versuchsreihen beweisen. Für eine objektive Beurteilung der Fehlerbreite der Methode ist es u.E. statthaft, solche "erklärbaren Ausreißer" aus den statistischen Berechnungen auszuschließen. In Tabelle (2) sind die Werte für diese "Ausreißer" in Klammern gesetzt.

Es ergeben sich dann ohne "Ausreißer" für alle Variationskoeffizienten Werte zwischen 2,9 % und 4,6 %.

Diese statistischen Ergebnisse gewinnen durch die Tatsache an Gewicht, daß ein zweiter Untersucher, der nicht mit der Methode vertraut war, mit ihnen übereinstimmte.

D.h., die SFPL-Bestimmung ist in der beschriebenen Modifikation nahezu "foolproof". Sie kann auch von einem wenig Geübten gut beherrscht werden und liefert reproduzierbare Ergebnisse.

Tabelle 2

E-Werte und statistische Auswertung

Untersucher A - 1. und 3. Serie

	Lfd. Nr.	Datum	Leerpapier	Plasma ungestoppt	Plasma gestoppt +1000 E Tras/ml	erkklärbare "Ausreißer"
1. Serie	1	14.9.	315 321	(688) (822) (701) (699) (686) (680)	(878) (913)	SFP beim Inkubieren nicht vollständig in das Plasma eingetaucht Ansatz 14.9., Auswertung 15.9. Eluieren 16.9., Photometer 17.9. Ansatz 15.9., Auswertung 17.9.
	2	15.9.	(332) (339)	(661) (644) (673) (698) (661) (653)	(837) (840)	
	3	17.9.	(385) (384)	(643) (600) (649) (654) (667) (662)	(735) (760)	
	4	18.9.	321	750 760 765 751 704 740 774 748 765 765		Zu wenig Elphor verbraucht
	5	19.9.	334	780 740 784 774 779 802 769 720 770 761		
	6	20.9.	336 324 (337) (338) (351)	724 761 789 768 (791) (827)	906 910 858 892 (910) (910) (910) (960)	
	7	21.9.	329 322 350 (300) (365) 347 324 346 344 345		835 840 850 835 825 865 910 872 965 910	
3. Serie	8	23.10.	325 328	999 703 741 750	+100 E Tras/ml 790 818	Zu wenig Aqua dest. verbraucht
	9	24.10.	326	740 727 712 751	763 769	
	10	26.10.	(360)	735 715 727 700	745 770	
		$\bar{n}$ $\bar{x}$ σ VK %	(27) (338,1) (19,4) (5,75) mit "Ausreißer" (A)	(56) (726,8) (50,3) (6,9) mit A ohne A	(24) (872,0) (54,6) (6,3) mit A ohne A 1000 E 100 E	

Tabelle 3

Meßwerte und statistische Auswertung

Untersucher B - 2, Serie

Lfd. Nr.	Datum	Leerpapier E-Wert	Plasma ungestoppt	Plasma gestoppt 1000 E Tras/ml E-Wert	Bemerkungen
1	22.9.	346 351	746 722 728 796 786 811	1012 1040 999	
2	23.9.	369 364 361 364 336	818 716 742 739 772		gestopptes Plasma zu spät inkubiert, nicht ausgewertet.
3	24.9.	357 343 361 368 358	722 771 769 809 779 767		
	n	12	17	3	
	$\bar{x}$	356,5	764,3	1017	
	σ	10,4	33,2	20,9	
	VK%	2,9	4,3	VK 2,0	

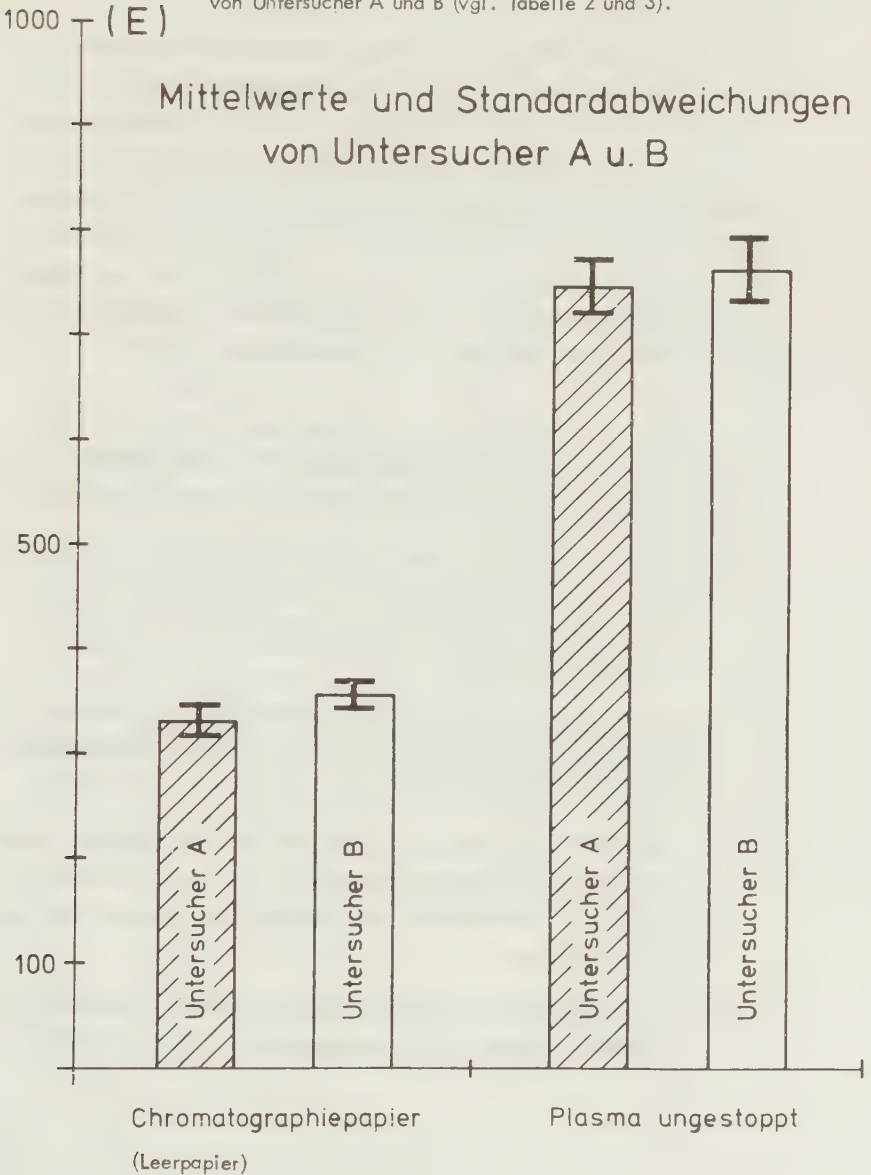
Zu Abbildung 4 graphische Darstellung der Ergebnisse der
2 Untersucher (A und B)

Mittelwerte ($\bar{X}$) und Standardabweichung (σ) von Leerpapier und ungestopptem Plasma veranschaulichen in Abb. 4 die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Untersucher (A und B) ohne "erklärbare Ausreißer".

Die Unterschiede zwischen den entsprechenden Mittelwerten von A und B bei Leerpapier und ungestopptem Plasma sind nicht signifikant.

Abbildung 4

Vergleich der Mittelwerte ($\bar{X}$) und Standardabweichungen (σ)
von Untersucher A und B (vgl. Tabelle 2 und 3).



4. Diskussion

Die letzte Version der Fibrinolysebestimmung kann gegenüber der Originalmethode auf die gleichen Fortschritte verweisen, die schon mit den Modellen 1974 und 1975 erreicht worden waren. Es sind dies vor allem Arbeits- und Zeitersparnis, weitergehende Standardisierung des Reagenzienverbrauchs und deren Einwirkungsdauer, schonendere Behandlung der SFP-Streifen, so daß die Randbezirke nicht mehr verworfen werden müssen und Ausschaltung der Geruchsbelastigung durch Elphorentfärber. Darüberhinaus gelang es mit dem neuen System zusätzliche Verbesserungen einzuführen und Schwierigkeiten zu beseitigen, welche die älteren Verfahren (1974 und 1975) aufwiesen.

- 4.1. Die vertikale Befestigung in einem Papierhalter verhindert das Verkleben der SFP-Streifen und den leidigen "Pfützeneffekt". Eine gleichmäßige Anfärbung der Testpapiere wird dadurch gewährleistet.
- 4.2. Die neue Schüttelvorrichtung ersetzt die weniger effektive Taumelscheibe. Die SFP werden gründlicher von angelagerten Plasmaproteinen oder evtl. auftretenden kleinen Gerinnseln befreit und intensiver gefärbt und entfärbt.
- 4.3. Die vertikale Anordnung in einer gering dimensionierten Plexiglasskammer (Boxe I) gestattet es, bis zu 11 SFP-Streifen in einem Versuchsdurchgang auszuwerten.
- 4.4. Durch den Verzicht auf Ein- und Abfluß bei der Inkubationsboxe (Boxe I), entfielen auch die Toträume im Leitungssystem und in den Ventilen, und wir konnten zu den originalen Mengenverhältnissen zwischen Puffer und Plasma zurückkehren.
- 4.5. Empfindliche und kostspielige technische Hilfsmittel, wie Elektropumpe und Beheizungssystem bei den vorausgegangenen Methoden entfallen.

- 4.6. Im Gegensatz zu den schon verwendeten, fast vollautomatischen Geräten, die sich u.a. als zu störanfällig erwiesen, kann das neue teilautomatische Verfahren bei Bedarf (z.B. bei Ausfall der elektrischen Steuerung) in den wesentlichen Funktionen mit der Hand bedient werden.
- 4.7. Die Verwendung von Aqua dest. beim Wässern verhindert Verkalkung der Elektroventile und Leitungssysteme und verlängert deren Funktionsfähigkeit.
- 4.8. Durch die Verwendung halbiertes SFP und die weiterreichende Standardisierung der Reagenzien, konnten materielle und finanzielle Einsparungen erzielt werden.

Mit der geschilderten Modifikation können die erhaltenen Werte wie bisher in die bekannte Formel (5, 13) zur Errechnung der prozentualen Lysquote eingesetzt werden. Damit kann die Methode bei der Bearbeitung der zunehmenden Fibrinolyse-Probleme eine wertvolle Hilfe sein. Solche treten nicht nur im diagnostischen Bereich, z.B. bei haemorrhagischen oder thrombophilen Diathesen auf, sondern auch bei therapeutischer Anwendung von Substanzen mit nachgewiesener oder fraglicher fibrinolytischer Wirkung.

Eine quantitative Bestimmungsmethode ist für die Dosierung von Fibrinolytika ebenso notwendig wie für die Anwendung von Antifibrinolytika.

C. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Entwicklung von teilautomatischen Geräten für die Standard-fibrinpapier-Lyse (SFPL) wird beschrieben und als Ergebnis eine verbesserte Bestimmungsmethode vorgestellt.

2. Prinzip dieser Methode ist: Inkubation und Auswertung der SFP mittels Papierhalter in fixierter vertikaler Position.

Entsprechend den unterschiedlichen Bestimmungsphasen (Inkubieren, Spülen, Eluieren) werden drei Kammersysteme verwendet. In den Kunststoffkammern sind für die einzelnen SFP Zellen (Untersuchungsfächer) untergebracht.

Ein neues Schüttelsystem mit Exzenter und Antriebsmotor zur rythmischen Vertikalbewegung des Papierhalters bewährte sich.

Der Reagenszulauf erfolgt aus höher gelagerten Glasflaschen. Die Zulaufmenge und der Ablauf werden von zwei Elektroventilen geregelt.

3. Reagenzienverbrauch und Versuchsdurchführung wurden standardisiert und eine neue Arbeitsanleitung mit Hinweisen und Fehlerquellen erstellt.

4. Zwei Untersucher prüften unter gleichen Versuchsbedingungen die Funktionsfähigkeit des Bestimmungssystems. Ihre Ergebnisse stimmten überein. Die Variationskoeffizienten (VK), als Maß für die Meßmethodengenauigkeit, liegen unter 5 %.

Die Methode ist demnach reproduzierbar und für den Routinegebrauch geeignet.

D. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Astrup, T., Müllertz, St.
The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity
Arch. Biochem. 40, 346 (1952)

- (2) Baymann, E., Bachner, U. und Eggeling, B.
Die Blutgerinnung während des normalen Zyklus. XIV. Hamburger
Symp. 1971, Schattauer Verlag

- (3) Beitinger, B.
Über die fibrinolytische Aktivität von Humanplasma unter ver-
schiedenen Lagerungsbedingungen, gemessen mit der Standard-
papierfibrinolyse;
med. Diss. (München 1972)

- (4) Fearnley, G.R.
Fibrinolysis. Edward Arnold Publishers Ltd, 14, London (1965)

- (5) Goossens, N.
Standardisierte Fibrinolysebestimmung
Med. Welt, 21, 1816 (1970)

- (6) Goossens, N. and Walcher, A.
Paper-Fibrinolysis- a new Quantitative Photometric Fibrinolysis
Method. Proc. of the IX Congr. of the Int.Soc. of Hematology,
Mexico 1962, II, 271, S. Karger Verlag (1963)

- (7) Hartert, I.
Messende Verfolgung der Blutgerinnung mit dem Hellige Thromb-
Elastographen
Hellige Nachrichten 13, 5 (1954)

- (8) Hess, H., Goossens, N. und Frost, H.
Behandlung rezidivierender Embolien in Extremitätenarterien
mit Streptokinase und Urokinase,
Fortschr. Med. 84 Jg. Nr. 7, 296-300 (1966)

- (9) Metze, R., Linke, P.G.
Ein Schnelltest zur Erfassung von fibrinolytischer Aktivität
Z. med. Labortechn. 13, 75 (1972)

- (10) Milstone, H.
J. Immunol. 42, 109 (1941)

- (11) Rath, H.
(noch nicht veröffentlicht)

- (12) Schorer, B.
Über die Standardisierung und Vereinfachung der Spontanpapier-
fibrinolyse (Elutionsmethode)
med. Diss. (München 1970)

- (13) Weber, B.
Untersuchungen über die fibrinolytische Aktivität des Plasmas gesunder
Versuchspersonen mit einer Modifikation der Standardpapierfibrinolyse
med. Diss. (München 1975)

- (14) Woyzuck, J.
(noch nicht veröffentlicht)

E . LEBENS LAUF

- | | |
|--------------|--|
| 6. Juli 1949 | als Sohn des Architekten Klaus Buchheim und seiner Ehefrau Rosa, geb. Böck, in München geboren |
| 1955 | Eintritt in die Volksschule Feldafing, Kreis Starnberg |
| 1959 | Übertritt in das neusprachliche Gymnasium Starnberg |
| 1968 | Reifeprüfung |
| 1969 SS | Zulassung zum Studium der Zahnheilkunde |
| 1970 SS | Zulassung zum Medizinstudium |
| 1975 | Staatsexamen der Humanmedizin |
| 1976 | Staatsexamen der Zahnheilkunde
Promotion in der Humanmedizin |



